

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003799

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-285543
Filing date: 29 September 2004 (29.09.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

07. 3. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 9 月 2 9 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 2 8 5 5 4 3

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

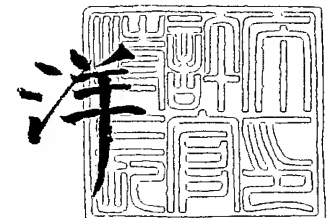
J P 2 0 0 4 - 2 8 5 5 4 3

出 願 人
Applicant(s): プリマハム株式会社

2 0 0 5 年 4 月 1 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 2004P2116
【提出日】 平成16年 9月29日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 33/53
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内
 【氏名】 秋元 政信
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内
 【氏名】 金井 聡
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内
 【氏名】 加藤 重城
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内
 【氏名】 浪岡 真
【特許出願人】
 【識別番号】 000113067
 【氏名又は名称】 プリマハム株式会社
 【代表者】 貴納 順二
【代理人】
 【識別番号】 100107984
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 廣田 雅紀
 【電話番号】 03-5575-6500
 【連絡先】 担当
【選任した代理人】
 【識別番号】 100102255
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小澤 誠次
【選任した代理人】
 【識別番号】 100123168
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 大▲高▼ とし子
【選任した代理人】
 【識別番号】 100120086
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 ▲高▼津 一也
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 044347
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 9701840

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

未変性小麦グリアジン及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識する抗小麦グリアジンモノクロナール抗体を用いることを特徴とする小麦アレルゲンの検出方法。

【請求項 2】

未変性小麦グリアジン及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識し、かつ異なるエпитープを認識する 2 種類の抗小麦グリアジンモノクロナール抗体を併用することを特徴とする小麦アレルゲンの検出方法。

【請求項 3】

未変性小麦グリアジン、還元カルボキシメチル化小麦グリアジン、0.1 M 酢酸可溶化小麦グリアジン、70 % エタノール可溶化小麦グリアジン、及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識し、かつ異なるエпитープを認識する 2 種類の抗小麦グリアジンモノクロナール抗体を併用することを特徴とする小麦アレルゲンの検出方法。

【請求項 4】

サンドイッチ ELISA により、未変性小麦グリアジン、還元カルボキシメチル化小麦グリアジン、0.1 M 酢酸可溶化小麦グリアジン、70 % エタノール可溶化小麦グリアジン、及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを、10 ~ 100 ppb の濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうることを特徴とする請求項 3 記載の小麦アレルゲンの検出方法。

【請求項 5】

抗小麦グリアジンモノクロナール抗体が、未変性小麦グリアジン、還元カルボキシメチル化小麦グリアジン、0.1 M 酢酸可溶化小麦グリアジン、70 % エタノール可溶化小麦グリアジン、及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識する抗小麦グリアジンモノクロナール抗体であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の小麦アレルゲンの検出方法。

【請求項 6】

抗小麦グリアジンモノクロナール抗体が、ハイブリドーマ (FERM AP-20210) が産生する抗小麦グリアジンモノクロナール抗体 PGL1 及び/又はハイブリドーマ (FERM AP-20211) が産生する抗小麦グリアジンモノクロナール抗体 PGL2 であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の小麦アレルゲンの検出方法。

【請求項 7】

未変性小麦グリアジン及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識する抗小麦グリアジンモノクロナール抗体を備えたことを特徴とする小麦アレルゲン検出用キット。

【請求項 8】

未変性小麦グリアジン及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識し、かつ異なるエпитープを認識する 2 種類の抗小麦グリアジンモノクロナール抗体を備えたことを特徴とする小麦アレルゲン検出用キット。

【請求項 9】

異なるエпитープを認識する 2 種類のモノクロナール抗体の少なくとも一つが、イムノクロマト用に用いられる金コロイドで標識されたモノクロナール抗体であることを特徴とする請求項 8 記載の小麦アレルゲン検出用キット。

【請求項 10】

モノクロナール抗体が、未変性小麦グリアジン、還元カルボキシメチル化小麦グリアジン、0.1 M 酢酸可溶化小麦グリアジン、70 % エタノール可溶化小麦グリアジン、及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識する抗小麦グリアジンモノクロナール抗体であることを特徴とする請求項 7 ~ 9 のいずれか記載の小麦アレルゲン検出用キット。

【請求項 11】

モノクロナール抗体が、ハイブリドーマ (FERM AP-20210) が産生する抗小麦グリアジンモノクロナール抗体 PGL1 及び/又はハイブリドーマ (FERM AP-20211) が産生する抗小麦グリアジンモノクロナール抗体 PGL2 であることを特徴

とする請求項 7 ～ 1 0 のいずれか記載の小麦アレルゲン検出用キット。

【請求項 1 2】

ハイブリドーマ (FERM AP-20210) が産生する抗小麦グリアジンモノクローナル抗体 PGL 1。

【請求項 1 3】

ハイブリドーマ (FERM AP-20211) が産生する抗小麦グリアジンモノクローナル抗体 PGL 2。

【書類名】明細書

【発明の名称】小麦アレルゲンの検出方法

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、食品等の試料中に含まれる未変性又は変性の小麦アレルゲンを定性的かつ定量的に高感度で分析することができる、小麦の主要タンパク質であるグリアジンを指標とした小麦アレルゲンの検出方法や、それに用いられる小麦アレルゲンの検出用キットに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

自然環境の減少、車や工場などからの排気ガス、住宅事情等、或いは食べ物の変化など様々な因子により、現在では、3人に1人が何らかのアレルギー疾患をもつといわれている。特に、食物アレルギーは、食品中に含まれるアレルギー誘発物質（以下、食物アレルゲンという）の摂取が引き起こす有害な免疫反応であり、皮膚炎、喘息、消化管障害、アナフィラキシーショック等を引き起こし、このような食物アレルギーの患者が増加していることから、医学上及び食品産業上、深刻な問題を生じている。これらの危害は死に至らせることがあり、未然に処置を施す必要がある。そのためには、表示を通じて消費者へ情報提供の必要性も高まっており、FAO/WHO合同食品規格委員会は、アレルギー物質として知られている8種の原材料を含む食品にあっては、それを含む旨の表示について合意し、加盟国で各国の制度に適した表示方法を検討することとした（1999年6月）。日本では過去の健康危害などの程度、頻度を考慮して重篤なアレルギー症状を起した実績のある24品目の食品について、その表示方法が定められた（2002年4月より施行）。アレルギーを引き起こす食品としては、卵類、牛乳類、肉類、魚類、甲殻類及び軟体動物類、穀類、豆類及びナッツ類、果実類、野菜類、ビール酵母若しくはゼラチンなどが知られており、特に小麦アレルゲンの主要成分としてグリアジンが知られている。

【0 0 0 3】

従来、アレルゲンの検出する方法としては、例えば、アレルゲンに特異的に反応するイムノグロブリンを定量する方法（特許文献1参照）や、抗原抗体複合体を含有する検体中の該抗原抗体複合体を酸処理等により解離させ、必要に応じてアルカリを用いて中和処理を行った後、該検体中のアレルゲン特異的IgE抗体を測定する方法（特許文献2参照）等が知られている。

【0 0 0 4】

また、現在、小麦の特定原材料を検出するための公定法として、加熱・非加熱複合抗原より得られるポリクローナル抗体を用いた免疫学的な検出方法（特許文献3参照；以下「市販公定法A」という）、あるいは精製抗原より得られたポリクローナル抗体を用いた免疫学的な検出方法（以下「市販公定法B」という）が用いられている。これらは、特異的にアレルゲンを検出するために有効な方法であるが問題も多い。例えば、市販公定法Aでは複合抗原を用いているため、何に対する抗体なのか不明で、交差性が高く、また非特異反応が増える可能性がある。また、市販公定法Bでは、抗原が精製されているため抗体の特異性は明確であるが、変性あるいは未変性により抗体の結合性に違いが生じるため、この抗体を使うと実際の含量を示していない場合が多い。特に、小麦は他の特定原材料（卵、乳、そば、落花生）の中でも過酷な加熱処理が施される場合が多い（例えばパン、唐揚げ等）ため、小麦アレルゲンは未変性から加熱変性まで、広範囲な状態で存在する。そこで、小麦アレルゲンを検出するためには、どの様な状態のアレルゲンに対して結合するかを明らかにしたモノクローナル抗体を作製し、その特性に応じて利用する必要がある。

【0 0 0 5】

【特許文献1】特開平05-249111号公報

【特許文献2】特開平07-140144号公報

【特許文献3】特開2003-155297号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】**【0006】**

本発明の課題は、小麦アレルゲンを含む食品において、小麦アレルゲンが変性／未変性のいかなる状態にあっても検出できる高感度な免疫学的な検出方法及びそれに用いられる検出キット等を提供することにある。

【課題を解決するための手段】**【0007】**

本発明者らは、精製グリアジンに対するモノクローナル抗体（以下「MAb」ということがある）を作出し、その中から未変性小麦グリアジン、還元カルボキシメチル化小麦グリアジン、0.1M酢酸可溶化小麦グリアジン、70%エタノール可溶化小麦グリアジン、及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識することができるMAbを複数選択し、サンドイッチELISAにより、未変性小麦グリアジン、還元カルボキシメチル化小麦グリアジン、0.1M酢酸可溶化小麦グリアジン、70%エタノール可溶化小麦グリアジン、及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを、10～100ppbの濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうるMAbの組合わせを見出した。また、これらのMAbを用いると、食品中の小麦アレルゲンがいかなる加工工程を経た場合にも、本発明による検出方法や検出キットを利用する者がより簡便に検査対象製品からの小麦アレルゲンを検出しうることを確認した。以上の知見に基づいて本発明は完成するに至ったものである。

【0008】

すなわち本発明は、未変性小麦グリアジン及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識する抗小麦グリアジンモノクローナル抗体を用いることを特徴とする小麦アレルゲンの検出方法（請求項1）や、未変性小麦グリアジン及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識し、かつ異なるエピトープを認識する2種類の抗小麦グリアジンモノクローナル抗体を併用することを特徴とする小麦アレルゲンの検出方法（請求項2）や、未変性小麦グリアジン、還元カルボキシメチル化小麦グリアジン、0.1M酢酸可溶化小麦グリアジン、70%エタノール可溶化小麦グリアジン、及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識し、かつ異なるエピトープを認識する2種類の抗小麦グリアジンモノクローナル抗体を併用することを特徴とする小麦アレルゲンの検出方法（請求項3）や、サンドイッチELISAにより、未変性小麦グリアジン、還元カルボキシメチル化小麦グリアジン、0.1M酢酸可溶化小麦グリアジン、70%エタノール可溶化小麦グリアジン、及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを、10～100ppbの濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうることを特徴とする請求項3記載の小麦アレルゲンの検出方法（請求項4）や、抗小麦グリアジンモノクローナル抗体が、未変性小麦グリアジン、還元カルボキシメチル化小麦グリアジン、0.1M酢酸可溶化小麦グリアジン、70%エタノール可溶化小麦グリアジン、及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識する抗小麦グリアジンモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の小麦アレルゲンの検出方法（請求項5）や、抗小麦グリアジンモノクローナル抗体が、ハイブリドーマ（FERM AP-20210）が産生する抗小麦グリアジンモノクローナル抗体PGL1及び／又はハイブリドーマ（FERM AP-20211）が産生する抗小麦グリアジンモノクローナル抗体PGL2であることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の小麦アレルゲンの検出方法（請求項6）に関する。

【0009】

また本発明は、未変性小麦グリアジン及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識する抗小麦グリアジンモノクローナル抗体を備えたことを特徴とする小麦アレルゲン検出用キット（請求項7）や、未変性小麦グリアジン及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識し、かつ異なるエピトープを認識する2種類の抗小麦グリアジンモノクローナル抗体を備えたことを特徴とする小麦アレルゲン検出用キット（請求項8）や、異なるエピトープを認識する2種類のモノクローナル抗体の少なくとも一つが、イムノクロマト用に用いられる金コロイドで標識されたモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項8記載の小麦アレルゲン検出用キット（請求項9）や、モノクローナル抗体が、未変性小麦グリア

アジン、還元カルボキシメチル化小麦グリアジン、0.1 M酢酸可溶化小麦グリアジン、70 %エタノール可溶化小麦グリアジン、及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識する抗小麦グリアジンモノクロナール抗体であることを特徴とする請求項7～9のいずれか記載の小麦アレルゲン検出用キット（請求項10）や、モノクロナール抗体が、ハイブリドーマ（FERM AP-20210）が産生する抗小麦グリアジンモノクロナール抗体PGL1及び／又はハイブリドーマ（FERM AP-20211）が産生する抗小麦グリアジンモノクロナール抗体PGL2であることを特徴とする請求項7～10のいずれか記載の小麦アレルゲン検出用キット（請求項11）に関する。

【0010】

さらに本発明は、ハイブリドーマ（FERM AP-20210）が産生する抗小麦グリアジンモノクロナール抗体PGL1（請求項12）や、ハイブリドーマ（FERM AP-20211）が産生する抗小麦グリアジンモノクロナール抗体PGL2（請求項13）に関する。

【発明の効果】

【0011】

本発明によると、食品等に含まれる小麦アレルゲン（抗原）についての免疫学的な検出方法において、小麦アレルゲンが、変性／未変性のいかなる状態にあっても正確に定性かつ定量的に検出することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明の小麦アレルゲンの検出方法としては、未変性小麦グリアジン及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識する抗小麦グリアジンモノクロナール抗体を用いる小麦アレルゲンの免疫学的な検出方法や、未変性小麦グリアジン及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識し、かつ異なるエピトープを認識する2種類の抗小麦グリアジンモノクロナール抗体を併用する小麦アレルゲンの免疫学的な検出方法であれば特に制限されず、また、本発明の小麦アレルゲン検出用キットとしては、未変性小麦グリアジン及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識する抗小麦グリアジンモノクロナール抗体を備えた免疫学的なアレルゲン検出用キットや、未変性小麦グリアジン及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識し、かつ異なるエピトープを認識する2種類の抗小麦グリアジンモノクロナール抗体を備えた免疫学的なアレルゲン検出用キットであれば特に制限されないが、上記抗小麦グリアジンモノクロナール抗体が未変性小麦グリアジン及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンに加えて、還元カルボキシメチル化小麦グリアジン、0.1 M酢酸可溶化小麦グリアジン、70 %エタノール可溶化小麦グリアジンをも認識しうる抗小麦グリアジンモノクロナール抗体が好ましく、ここで「小麦アレルゲン」とは小麦の主要なタンパク質グリアジンを含むものをいう。上記免疫学的な小麦アレルゲンの検出方法は、未変性／変性小麦グリアジンを含む試料を、標識化した抗小麦グリアジンMAbと接触させ、あるいは標識化した抗体の存在下に抗小麦グリアジンMAbと接触させ、抗原抗体反応により標識化免疫複合体として捕捉する免疫反応段階と、生成した該免疫複合体をその分子中に存在する標識物質を用いて分離・測定する検出段階とからなり、かかる免疫反応段階における抗原抗体反応の方法も特に制限されず、例えば、以下の方法を例示することができる。

【0013】

不溶性担体に結合した抗小麦グリアジンMAbに試料中の小麦アレルゲンを捕捉させた後に標識化抗IgG抗体を反応させるサンドイッチ法や、不溶性担体に結合した抗小麦グリアジンMAbと異なるエピトープを認識する標識化抗小麦グリアジンMAb（第二抗体）を用いるサンドイッチ二抗体法や、不溶性担体に結合した抗小麦グリアジンMAbに試料中の小麦アレルゲンを標識化抗原の存在下で反応させる競合法や、小麦アレルゲンを含有する試料にこれらと特異的に反応する磁気ビーズ結合標識化抗小麦グリアジンMAbを作用させさせた後、磁力により分離した免疫複合体中の標識物質を検出する磁気ビーズ法や、小麦アレルゲンを含有する試料にこれらと特異的に反応する標識化抗小麦グリアジンMAbを作用させて凝集沈殿させた後、遠心分離により分離した免疫複合体中の標識物質

を検出する凝集沈殿法や、金コロイド等で標識された抗小麦グリアジンMA bと小麦アレルゲンが結合した抗原抗体複合体が試験ストリップ上を毛管現象等により移動する途中に、小麦アレルゲンと結合する抗小麦グリアジンMA bをあらかじめ固定しておき、抗原抗体複合体を補足させることで現れる着色ラインの有無によって定性分析するイムノクロマト法その他、二重免疫拡散法、放射免疫拡散法など公知の免疫測定法を利用することができるが、未変性小麦アレルゲン及び／又は変性小麦アレルゲンを認識するモノクローナル抗体として、それぞれ異なるエピトープを認識する2種類のモノクローナル抗体を用いる方法、例えば、食品中の未変性グリアジン及び／又は変性グリアジンが10～100 ppbの濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうる高感度の点でサンドイッチ二抗体法が、定性的には簡便性からイムノクロマト法が好ましい。

【0014】

上記抗原抗体反応において用いられる不溶性担体としては、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子化合物、その他、ガラス、金属、磁性粒子及びこれらの組み合わせ等を挙げることができ、また、不溶性担体の形状としては、例えば、トレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、マイクロプレート、試験管、ラテックスビーズ状等の種々の形状で用いることができる。更に、これら不溶性担体への抗原又は抗体の固定化方法は特に限定されるものでなく、物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法等を用いることができる。

【0015】

本発明の小麦アレルゲンの検出方法や小麦アレルゲン検出用キットに用いられる抗小麦グリアジンMA bの免疫グロブリンのクラス及びタイプは特に制限されないが、抗グリアジンMA bや抗グリアジンMA bとして、Ig Gクラス、タイプ κ の抗体が好適に用いられる。また、モノクローナル抗体の形態としては、全抗体又はF(a b')₂、Fab等の断片を用いることもできる。抗体の由来は特に限定されるものではないが、マウス、ラット、ヒト、兎、羊、山羊、鶏等を挙げることができるが、作製の簡便性からマウスに由来するモノクローナル抗体が好適に用いられる。また、抗小麦グリアジンMA bは、未変性又は変性小麦アレルゲンで免疫した動物から採取した抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合により調製されるハイブリドーマを培地上で培養するか、又は動物腹腔内に投与して腹水内で増殖させた後、該培養物又は腹水から採取することにより製造することができる。

【0016】

抗小麦グリアジンMA b産生ハイブリドーマは、例えば、未変性及び／又は変性小麦グリアジンを用いてBALB/cマウスを免疫し、免疫されたマウスの抗体産生細胞とマウスミエローマ細胞とを、常法により細胞融合させ、免疫蛍光染色パターンによりスクリーニングすることにより、抗未変性／変性小麦グリアジンMA b産生ハイブリドーマを作出することができる。上記の抗体産生細胞としては、例えば未変性及び／若しくは変性小麦グリアジン又はこれを含む組成物を投与して免疫した動物から得られる脾臓細胞、リンパ節細胞、B-リンパ球等を挙げることができる。免疫する動物としてはマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマ等が挙げられる。免疫は、例えば未変性及び／又は変性小麦グリアジンをそのまま又は適当なアジュバントと共に動物の皮下、筋肉内又は腹腔内に1～2回／月、1～6ヶ月間投与することにより行なわれる。抗体産生細胞の分離は、最終免疫から2～4日後に免疫動物から採取することにより行なわれる。ミエローマ細胞としては、マウス、ラット由来のもの等を使用することができる。抗体産生細胞とミエローマ細胞とは同種動物由来であることが好ましい。

【0017】

細胞融合は、例えばダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)等の培地中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコール等の融合促進剤の存在下で混合することにより行なうことができる。細胞融合終了後、DMEM等で適当に希釈し、遠心分離し、沈殿をHAT培地等の選択培地に懸濁して培養することによりハイブリドーマを選択し、

次いで、培養上清を用いて酵素抗体法により抗体産生ハイブリドーマを検索し、限界希釈法等によりクローニングを行ない、抗グリアジン小麦グリアジンMA bを産生するハイブリドーマを得ることができる。また、未変性小麦アレルゲンのみを用いて免疫した抗免疫動物から、有利に抗変性小麦グリアジンMA bを得ることができる。この場合、抗変性小麦グリアジンMA b産生ハイブリドーマをスクリーニングしてもよいし、あるいは、固相状態でのELISAで未変性小麦アレルゲンに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択し、この抗体産生ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体から液相状態で未変性小麦アレルゲンに対してのみ特異的に反応する抗変性小麦グリアジンMA bを得ることができる。前記のように、抗体産生ハイブリドーマを培地中又は生体内で培養しモノクローナル抗体を培養物から採取することができるが、培養物又は腹水からのモノクローナル抗体の分離・精製方法としては、タンパク質の精製に一般的に用いられる方法であればどのような方法でもよく、例えば、IgG精製に通常使用される硫酸分画法、陰イオン交換体又はプロテインA、G等のカラムによるクロマトグラフィーによって行なうことができる。

【0018】

また、標識化抗体作製に用いられる標識物質としては、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらしことができる標識物質であればよく、酵素、蛍光物質、化学発光物質、放射性物質、金コロイド等を使用するのができ、酵素としてはペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等を、蛍光物質としては、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等を、発光物質としては、ルミノール類、ジオキセタン類、アクリジニウム塩類等を、放射性物質としては ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 若しくは ^{131}I 等を例示することができる。標識物質が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤、蛍光剤、発光剤等を用いることができる。

【0019】

本発明の小麦アレルゲン検出用キットには、有効成分としての抗小麦グリアジンMA b、好ましくはそれぞれ異なるエピトープを認識する2以上の抗小麦グリアジンMA bを含むが、これらは保存安定性の点から、溶液状態よりも凍結乾燥物として収容されていることが好ましく、検出用キットにはかかる抗小麦グリアジンMA b溶解する緩衝液や培養液の他、試料を調製するための緩衝液等を含んでいてもよい。また、より好ましい別の態様の本発明の小麦アレルゲン検出用キットとしては、前記イムノクロマト法における試験ストリップを挙げることができる。この場合、異なるエピトープを認識する2種類のモノクローナル抗体の少なくとも一つを、イムノクロマト用に用いられる金コロイドで標識されたモノクローナル抗体とすることが好ましい。

【0020】

本発明のモノクローナル抗体としては、抗小麦グリアジンモノクローナル抗体PGL1や抗小麦グリアジンモノクローナル抗体PGL2を挙げることができ、モノクローナル抗体PGL1産生ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体PGL2産生ハイブリドーマは、2004年9月7日にそれぞれ受領番号FERM AP-20210及びFERM AP-20211として、独立行政法人産業技術総合研究所 特許性物寄託センターに受託されている。

【0021】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

【0022】

[変性／未変性小麦グリアジンに結合可能なMAbの確立]

1. 材料及び方法

1) 小麦グリアジン (以下「GL」という) の調製

小麦粉に2倍量のn-ブタノールを加え脱脂を行い、一晚風乾した。得られた脱脂小麦粉に0.1%塩化ナトリウム溶液を2倍量加え、10,000rpm×15分遠心分離した。得られた沈殿に20倍量の0.01N酢酸を加え、攪拌後、10,000rpm×15分遠心分離した。得られた上清を蒸留水で透析し、凍結乾燥を行った。得られた凍結乾燥物に70%となるようにエタノールを加え、10,000rpm×15分遠心分離した。得られた上清を蒸留水で透析し、粗GL画分を得た。粗GL画分はさらに、Sephacryl S-200HR (Amersham Biosciences) を用いたゲルろ過により精製した。移動相には0.1N酢酸を用いてGLを分画し、蒸留水に透析後、凍結乾燥を行った。生理食塩水でこの凍結乾燥物の0.1%溶液を調製し、1ml容エッペンドルフチューブに500μlずつ分注し、免疫に供するまで-20℃で凍結保管し、抗原溶液とした。

【0023】

2) 免疫

供試動物として、5週齢のBALB/cマウス (日本クレア株式会社製) 5尾を用いた。初回免疫には、完全フロイントアジュバント (Difco) を0.1%のGLが500μl入ったエッペンドルフチューブに等量加え、ボルテックスミキサーにて攪拌して作製したエマルジョンを供試した。このエマルジョンを1尾当たり150μl腹腔内に注射した。また、追加免疫は、3週間の間隔で2回行った。免疫には、不完全フロイントアジュバント (Difco) を0.1%のGLが500μl入ったエッペンドルフチューブに等量加え、ボルテックスミキサーにて攪拌して作製したエマルジョンを供試した。このエマルジョンを1尾当たり150μl腹腔内に注射した。

【0024】

3) 血中抗体価の測定

初回あるいは追加免疫でGLを注射した1週間後に、各BALB/cマウスの尾部静脈より採血を行った。採血した血液は室温に2時間放置後、遠心分離を行い、血清を得た。これらの血清の10倍希釈段を作製し、非競合法ELISAによりマウス血中の抗GL抗体価を調べた。なお、二次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG (H+L) 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 製) を用いた。

【0025】

4) ハイブリドーマの作製

ハイブリドーマの作製は、ケラーとミルシュタインの方法 (1975) に従った。すなわち、十分に抗体価が上がったマウスに、0.1%GL溶液100μlを尾部静脈より注射した。静脈注射から4日後、マウスより脾臓を無菌的に摘出した。脾臓を細切後、RPMI 1640で洗浄して、滅菌ナイロンメッシュ (Cell Strainer, 70 μm, Becton Dickinson) を通し、脾臓細胞懸濁液を得た。1,000rpm×10分の遠心分離により脾臓細胞を集め、再度RPMI 1640で再懸濁し細胞数をカウントした。この脾臓細胞懸濁液とマウスミエローマ細胞 (P3X63Ag8.653) 懸濁液を細胞数が10:1になるように混合し、再度1,000rpm×10分の遠心分離を行い、ペレットを得た。このペレットに平均分子量3,350の45%ポリエチレングリコールを滴下し細胞融合を行った。細胞溶液にRPMI 1640を加え希釈後、遠心分離でペレットにした。このペレットに、ハイブリドーマ用培地 (10%牛胎児血清、40μMの2-メルカプトエタノール、100U/mlのペニシリン、100μg/mlのストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地) に100μMのヒポキサンチン、0.4μMのアミノプテリン、16μMのチミジンを含むHAT選択培地を加え、5×10⁶ cells/wellとなるように24ウェルの細胞培養用プレート (Becton Dickinson) に分注し、5%CO₂ 下37℃で培養した。

【0026】

5) 限界希釈法によるクローニング

細胞培養用プレートの各ウェルの培養上清について、ELISAの一次抗体として供試

し、抗GL抗体を産生しているハイブリドーマの存在を調べた。ELISAによりGLに対して陽性を示したウェルのハイブリドーマについて、0.9 cell/wellとなるように96ウェルの細胞培養用プレート (Becton Dickinson) に移し、限界希釈法によるクローニングを行った。なお、フィーダー細胞として、4週齢BALB/cマウス胸腺細胞を 5×10^6 cells/wellとなるように96ウェル細胞培養用プレートの各ウェルに加えた。クローニングされたハイブリドーマの培養には、10%牛胎児血清、40mMの2-メルカプトエタノール、100U/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地を用いた。

【0027】

6) 抗体のスクリーニング

モノクローナル抗体のスクリーニングは、未変性GL (以下「NGL」という) あるいは還元カルボキシメチル化GL (以下「RCMGL」という)、0.1M酢酸可溶化GL (以下「AGL」という)、70%エタノール可溶化GL (以下「EGL」という)、変性剤で可溶化したGL (以下「DGL」という) に対する反応性の違いを調べることで特異性の異なるクローンを得ることとした。RCMGLは、精製GLを10mg量り、1.4Mトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.6) 1ml、5% EDTA 100 μ l、1.2g尿素、33 μ lの2-メルカプトエタノールを加え2.5mlに定容した後、窒素ガス置換を行い、37℃、1時間の還元処理を行った。さらに、1MのNaOH 300 μ lに溶解した89mgのモノヨード酢酸を加え窒素ガス置換した後、室温で1時間のカルボキシメチル化を行い、RCMGLとした。培養上清のNGL、RCMGL、AGL、EGL及びDGLに対する反応性を非競合法ELISAにより調べた。

【0028】

7) 腹水の採取及びMAbの精製

Jonesら (1990) に従い、まず、BALB/cマウスに不完全フロイントアジュバントを0.2ml腹腔内に注射した。1週間後、一尾当たり 5×10^6 cellsのクローニングされたハイブリドーマを接種した。腹水貯留後、シリンジにより腹水を採取した。採種した腹水をProtein G カラム (アマシャム ファルマシア) により精製した。

【0029】

8) MAbのクラス、サブクラス及びタイプ

MAbのクラス及びサブクラスについては、Monoclonal mouse immunoglobulin isotyping kit (Pharmingen) により、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、IgL (k) 及びIgL (g) を決定した。

【0030】

9) MAbのビオチン化

精製したMAbについて、サンドイッチELISAに供試するため、それぞれビオチン処理を行った。50mMの炭酸緩衝液 (pH 8.5) を用いて20mg/mlとなるよう調製し、DMSOに3mg/100 μ lで溶解したNHS-ビオチン溶液を10 μ l加え、攪拌後、氷冷しながら2時間静置した。その後、20mg/mlとなるようにPBSで置換した。

【0031】

2. 結果

1) MAbの選択

小麦の主要アレルゲンであるグリアジン (GL) は、水に不溶性で、酢酸やエタノールに溶けるタンパク質である。そこで、PBSに溶かしたGL (NGL)、還元カルボキシメチル化GL (RCMGL)、0.1M酢酸可溶化GL (AGL)、70%エタノール可溶化GL (EGL)、変性剤で可溶化したGL (DGL) を調製し、どの状態のGLに特異的に結合するMAbであるかを検証した。抗GLMAbの各状態のGLに対するダイレクトELISAの結果を表1に示す。表1に示されるように、全ての状態のGLに結合するMAbであるPGL1、PGL2、PGL4、PGL7を選択した。

【0032】

【表1】

	NGL	RGL	AGL	EGL	DGL	クラス、サブクラスおよびタイプ
PGL1	○	○	○	○	○	IgG1(κ)
PGL2	○	○	○	○	○	IgG1(κ)
PGL3	○	△	○	×	○	IgG1(κ)
PGL4	○	○	○	○	○	IgG1(κ)
PGL5	○	△	○	△	△	IgG1(κ)
PGL6	○	×	○	○	○	IgG1(κ)
PGL7	○	○	○	○	○	IgG1(κ)
PGL8	○	△	○	×	○	IgG1(κ)

【0033】

2) サンドイッチELISAにおける組合せ条件

ダイレクトELISAで選択したPGL1、PGL2、PGL4、PGL7を用いて、全てのMAbの組合せについてサンドイッチELISAを行った。グリアジンはNGL、RCMGL、AGL、EGL、DGLを用いた。その結果、いずれの状態のGLでも最も高く検出できたのは、PGL1とPGL2の組合せであった。PGL1とPGL2を用いたサンドイッチELISAの結果を図1に示す。その他の組み合わせについてはサンドイッチELISAにて全てのGLを検出できない、または検出感度が極めて低かった。以上の結果から、食品に様々な状態で含まれるGLを検出するMAbとして、PGL1とPGL2を選択した。

【実施例2】

【0034】

[PGL1とPGL2の認識するエピトープの相違]

イムノブロットティングで、各抗体が認識するエピトープを限定するため、A-PAGEとエレクトロブロットティングに続いてイムノブロットティングを行った。まず、小麦グリアジンをLafiandra, D. & Kasarda, D. D. に従いA-PAGE (Cereal Chemistry, 62, 314-319, 1985) により分離した。分離したゲルを用いて、エレクトロブロットティングによりPVD F膜に転写した。転写したPVD F膜にPGL1とPGL2の培養上清(1/1000)を反応させたのち、発色させて、認識するエピトープを確認した。その結果、図2に示されるように、PGL1で認識されるタンパク質分解バンドがPGL2では認識されなかった。このことから、PGL1とPGL2とは異なるエピトープを認識することがわかった。

【0035】

[イムノクロマトによる変性及び未変性GLの検出]

1. 材料及び方法

1) 金コロイド標識及びコンジュゲートパッドの作製

2 mMホウ酸緩衝液(pH 9.0)で1 mg/mlとなるようにPGL1(又はPGL2)溶液を調製した。あらかじめ0.2 M炭酸カリウム溶液でpH 9.0に調製した金コロイド溶液(シグマ社製) 5 mlにMAb溶液を500 μ l加え、室温で30分間反応した後、10%BSA溶液を625 μ lを加え、さらに15分間反応させた。遠心分離を行い、1%BSA溶液でOD 525 = 1.0になるよう調製した。ガラスウール製コンジュゲートパッド(日本ミリポア社製)に68 μ l/cm²となるよう塗布し、乾燥させた。

【0036】

2) 抗体固定化メンブレンの作製

PBSで4 mg/mlとなるようPGL2(又はPGL1)溶液を調製し、ニトロセルロースメンブレンに直線状に塗布し乾燥させた。その後、1%BSA、0.1%Tween 20を含むPBSで37℃、2時間ブロッキング後、PBSで洗浄し乾燥させた。

【0037】

3) イムノクロマトストリップの組立と評価

上記で作製したコンジュゲートパッド、抗体固定化メンブレンに加えて、被検液スポット用のガラスウール製サンプルパッド、被検液吸収用のガラスウール製吸収パッドを別途用意し、サンプルパッド、コンジュゲートパッド、抗体固定化メンブレン、吸収パッドの順にそれぞれ貼り付け、イムノクロマトストリップとした。

【0038】

被検液としては、小麦粉に20倍量のPBST（PBSにポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート0.5%加えたもの）を加え4℃で一晩攪拌し、遠心分離後に脱脂処理した上清を回収し、透析後、凍結乾燥したものを小麦粉抽出物として調製した。調製した小麦粉抽出物を用いて、未変性のもとしてPBSで希釈したもの、変性のもとして変性剤で可溶化したものを用いた。

【0039】

2. 結果

サンドイッチELISAにより様々な状態のGLを検出できたことから、より簡易な検出方法としてイムノクロマトによる検出系を構築し、評価した。評価にあたっては、現在市販されているアレルゲン検出キットと同じ抗体を用いている市販A及び市販Bと比較した。結果を表2に示す。なお、表2中、「非特異反応」は、緩衝液のみを供したときに陽性と判定されたとき「あり」とした。その結果、市販Aでは、未変性小麦粉抽出物は検出できたが、変性小麦粉抽出物は非特異反応が見られ判定できなかった。また、市販Bでは、未変性小麦粉抽出物では1ppmでも検出できず、変性小麦粉抽出物は非特異反応が見られ判定できなかった。本発明のキットを用いる方法では、未変性小麦粉抽出物、変性小麦粉抽出物のどちらも50ppb程度まで検出することができた。また、変性小麦粉抽出物での非特異反応は見られなかった。

【0040】

【表2】

小麦粉抽出物（未変性）

	1ppm	100ppb	50ppb	10ppb	非特異反応
本発明方法	○	○	○	×	なし
市販A	○	○	○	×	なし
市販B	×	×	×	×	なし

小麦粉抽出物（変性）

	1ppm	100ppb	50ppb	10ppb	非特異反応
本発明方法	○	○	○	△	なし
市販A	—	—	—	—	あり
市販B	—	—	—	—	あり

【0041】

次に、実際の食品からのアレルゲン検出を想定して、市販の食パンを用いて評価した。評価にあたっては、現在市販されているアレルゲン検出キットを用いる市販A及び市販Bと比較した。結果を表3に示す。なお、表3中、「非特異反応」は、緩衝液のみを供したときに陽性と判定されたとき「あり」とした。食パンのたんぱく質は約8%であるため、以下の濃度は8%を全量抽出したと仮定した数字となる。評価した結果、市販Aでは、未変性食パンを4ppm以下の濃度では検出できず、変性食パンでは非特異反応が見られ、判定できなかった。市販Bでは、4ppm程度は検出できたものの、それ以外の濃度では検出できず、また変性食パンでは非特異反応が見られ、判定できなかった。本発明のキットを用いる方法では、未変性食パン、変性食パンのどちらも40ppb程度の低濃度でも検出ができ、変性では非特異反応もなく、検出できることがわかった。

【0042】

【表 3】

未変性 食パン（濃度はたんぱく質濃度換算）

	400ppm	4ppm	400ppb	40ppb	非特異反応
本発明方法	○	○	○	△	なし
市販A	×	○	×	×	なし
市販B	○	×	×	×	なし

変性 食パン（濃度はたんぱく質濃度換算）

	400ppm	4ppm	400ppb	40ppb	非特異反応
本発明方法	○	○	○	△	なし
市販A	—	—	—	—	あり
市販B	—	—	—	—	あり

【図面の簡単な説明】

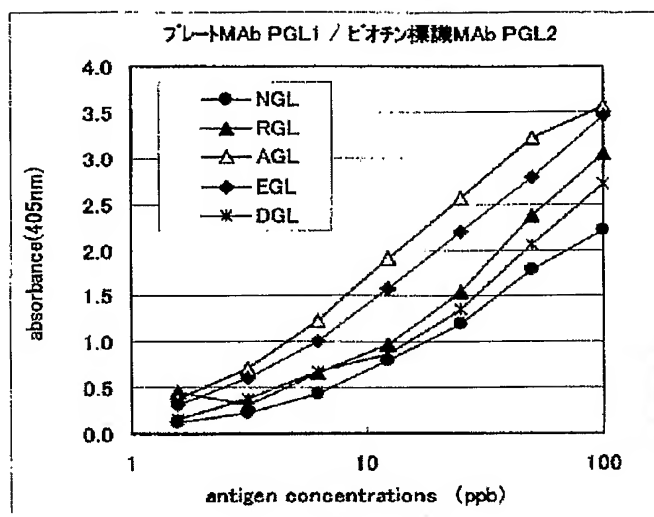
【0043】

【図1】本発明の2種類の抗グリアジンMAbを用いた、各種状態のグリアジンに対するサンドイッチELISAの結果を示す図である。

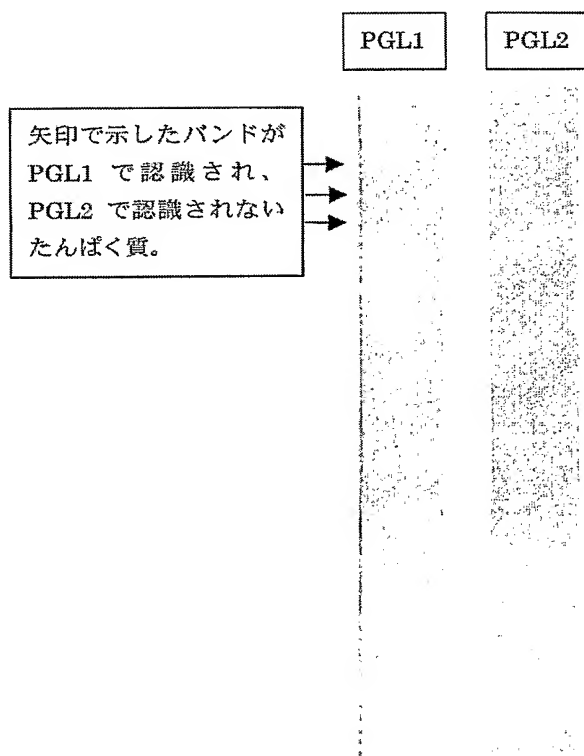
【図2】本発明のPGL1およびPGL2の認識する小麦グリアジンの構成たんぱく質の相違を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 小麦アレルゲンを含む食品において、小麦アルゲンが変性／未変性のいかなる状態にあっても検出できる高感度な免疫学的な検出方法及びそれに用いられる検出キット等を提供すること。

【解決手段】 未変性小麦グリアジン、還元カルボキシメチル化小麦グリアジン、0.1 M酢酸可溶化小麦グリアジン、70%エタノール可溶化小麦グリアジン、及び変性剤で可溶化した小麦グリアジンを認識し、かつ異なるエピトープを認識する2種類の抗小麦グリアジンモノクローナル抗体を併用して、小麦アレルゲンを検出する。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-285543
受付番号	50401660927
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成 16 年 9 月 30 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000113067
【住所又は居所】	東京都品川区東大井 3 丁目 17 番 4 号
【氏名又は名称】	プリマハム株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】	100107984
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	廣田 雅紀

【選任した代理人】

【識別番号】	100123168
【住所又は居所】	東京都港区赤坂 2 丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	大▲高▼ とし子

【選任した代理人】

【識別番号】	100120086
【住所又は居所】	東京都港区赤坂 2 丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	▲高▼津 一也

【選任した代理人】

【識別番号】	100102255
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	小澤 誠次

特願 2 0 0 4 - 2 8 5 5 4 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 1 1 3 0 6 7]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 5 月 1 6 日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都品川区東大井 3 丁目 1 7 番 4 号
氏 名 プリマハム株式会社